动 物 学 研 究 1996，17（3）：331—336 CN 53—1040／Q ISSN 0254—5853
Zoological Research

特殊涡鞭毛虫——尖尾虫染色体与典型涡鞭毛虫染色体的比较研究*

张超英 曾丛梅[1] 李靖炎[2]
（中国科学院昆明动物研究所细胞与分子进化开放研究实验室 昆明 650223）

摘要 我们实验室与上海细胞生物学研究所的有关同志多年来在特殊涡鞭毛虫——尖尾虫（*Oxyrrhis marina*）的细胞生物学和生物化学上作了一系列的研究，本文所报道的是这些工作中的一部分。

对尖尾虫（*Oxyrrhis marina*）的永久浓聚染色体的精细形象以及不同固定方法对其精细形象的影响作了观察，并与人肠道细菌的类核体、典型涡鞭毛虫原甲藻（*Prorocentrum micans*）和鞭毛虫眼虫（*Euglena* sp.）的永久浓聚染色体作了比较。结果表明，细菌的类核体的精细形象受固定方法的影响极大、反之，不同的固定方法对于眼虫染色体的精细形象则看不出有任何显著的影响。至于典型涡鞭毛虫类的染色体，单用 OsO_4 或用戊二醛-OsO_4 双固定法固定，都会得到典型涡鞭毛虫类染色体的横带样结构，然而单纯用戊二醛固定，却会得到大不相同的形象。在这方面尖尾虫的染色体与一般的涡鞭毛虫类的染色体相距甚远，其染色体的精细形象本身也与眼虫类的染色体较为相似，而与一般涡鞭毛虫类的大不相同。

本工作所得到的结果与以前我们在不同方面所得到的结果一致。研究结果全都表明，尖尾虫与典型涡鞭毛虫有着一系列重大的差异，实际上代表着一个介于一般鞭毛虫类与典型涡鞭毛虫类之间的特殊类群；因此建议在原生生物中设立一个新的门——尖尾虫门（Phylum Oxyrrhinea）。这一主张正好与 90 年代国际上对尖尾虫与大量的涡鞭毛虫所作的分子进化研究结果（Lenaers 等，1991）相吻合。

关键词 尖尾虫，涡鞭毛虫，染色体，不同固定方法的效果，尖尾虫门

涡鞭毛虫类（甲藻）的细胞核，由于其中所含的染色体非常相似于细菌的类核体（拟核），因而可视为原始性细胞核的一种模型。其有丝分裂也极其特殊（KuBai 等，1969）不仅不同于多细胞动植物的典型有丝分裂，而且与任何其它原生生物的有丝分裂类型都不相同。

尖尾虫是一种特殊的涡鞭毛虫，在藻类学中它被认为属于甲藻门，横裂甲藻纲，多甲藻目，裸甲藻亚目，原夜光藻（虫）科。Corliss 把原生生物划为 18 大类群、45 门；涡鞭毛虫类群包括多甲藻（虫）门（Peridinea）与合沟虫门（Syndinea），而尖尾虫则被划归

---

* 国家自然科学基金资助项目内容
张超英现在工作单位：中国科学院动物研究所 北京 100080
[1] 中国科学院生物物理研究所 北京 100101 [2] 本文的通讯作者
本文 1995 年 7 月 7 日收到，1996 年 3 月 4 日修回

多甲虫门（Corliss, 1984）。但中国科学院昆明动物研究所进化细胞生物学实验室与上海细胞所的一些同志多年的工作表明，尖尾虫在一系列重要的细胞生物学与分子生物学特性上都与一般的涡鞭毛虫类有根本的差异[有丝分裂方式（Gao 等，1986）；染色体的亚显微结构，染色体碱性蛋白的性质和数量（李靖炎等，1978，1979；孙毓麟等，1978；文建凡等，待发表）；在经热三氯醋酸处理以除去 DNA 时，其染色体并不会像一般涡鞭毛虫类的染色体那样整个被溶去（李靖炎等，1978，1979）；染色质中含有为一般涡鞭毛虫类所没有的类似于核小体的结构（Fan 等，1981；高小平，未发表）]；涡鞭毛虫类普遍有一种奇特的分子生物学特征，即其核 DNA 中含有相当多量的一种极其特殊的碱基——羟甲基尿嘧啶，后者竟至取代了胸腺嘧啶的 12%—17%（Rizzo, 1987），而上海细胞所的张志新发现尖尾虫的 DNA 中并无此种碱基。尖尾虫与一般涡鞭毛虫之间的差异显然远远地大于横裂和纵裂的两大类涡鞭毛虫之间的差异。为此，我们以前就提出了尖尾虫代表着一个独立的亚门或门的见解（Li, 1990）。

本工作是上述有关尖尾虫研究的继续。研究表明，尖尾虫的染色体不仅在亚显微构造上迥然不同于一般的涡鞭毛虫类的染色体，而且其精细形象并不会因为固定方法的不同而有明显的改变。在这两方面它都与眼虫类的致密染色体相类似。

1 材料与方法

尖尾虫与典型涡鞭毛虫——闪光双甲藻（原甲藻 *Prorocentrum micans*）都是本实验室长期培养的种类。眼虫（*Euglena* sp.）自野外采得。人肠道细菌未定种。除了上述种类外还用小鼠胸腺作对比。

固定方法主要有 3 种：单纯戊二醛固定（3%戊二醛，0.2 mol／L PBS, pH7.0，室温下固定 1 h；固定尖尾虫时加入 1 mol／L 蔗糖以平衡渗透压）；单纯锇酸固定（1.5%锇酸，0.05 mol／L 二甲砷酸钠缓冲液，pH7.0，室温下固定 1 h）；戊二醛-锇酸双固定。固定细菌还用了“R-K 法”，即 Ryter 和 Kellenberger 的所谓“标准方法”（Ryter 等，1958）。

Epon 812 包埋，超薄切片，醋酸双氧铀染色，H-300 透射电镜观察。

2 观察结果与讨论

作为对照的人肠道细菌的类核体的精细形态，与文献上有关的报道相符，会因固定方法的不同而有很大的差异。戊二醛固定所得的结果很不理想，染色质剧烈收缩，从而出现许多空白区域（图版Ⅰ：1)。锇酸固定所得的则有些不同，类核体呈现为在空白区域中存在的染色质网（图版Ⅰ：2)。“R-K 法”所得结果与锇酸固定所得的有些相似，但染色质的网索显得更细（图版Ⅰ：3)。染色质网索最细，分布也最为均匀的是先用戊二醛固定，再用“R-K 法”做后固定所得的形象（图版Ⅰ：4)。常规的戊二醛加锇酸双固定所得的结果完全是不同的，类核体呈现为由致密的染色质粗索所组结成的结构（图版Ⅰ：5)。

作为另一种对照的眼虫细胞核中的致密染色体，经不同的方法固定后，其精细形象彼此没有什么不同（图版Ⅰ：6—8)。小鼠胸腺细胞核中的异染色质也同样如此。

闪光双甲藻作为一种典型的涡鞭毛虫，在用锇酸固定后，或在用戊二醛-锇酸双固定后，其染色体的亚显微结构中都显现了为涡鞭毛虫染色体所特有的横带样精细形象（图版

Ⅱ：10，11），与文献上有关报道完全相符。但是如果单纯只用戊二醛固定，则造成染色质剧烈收缩，形成了一些不规则的横走的粗索，其间则为由收缩而造成的空白，根本看不到涡鞭毛虫染色体所特有的精细结构（图版Ⅱ：9）。

闪光双甲藻染色体的直径大体是一致的。尖尾虫的染色体则不然，既然在同一个核中，不同的染色体彼此间也有很大的差别。其断面的轮廓也很不规则，从而与闪光双甲藻的有明显的区别。内部结构的区别则更大、用任何方法固定，在尖尾虫的染色体中也不会出现涡鞭毛虫染色体所特有的规则性的横带样结构（图版Ⅱ：12—14）。而且无论用哪一种固定方法，其染色体内部的亚显微形象都没有什么不同。即使只用戊二醛固定，其染色体也不会发生收缩从而造成空白区。所有这几点全部都与典型涡鞭毛虫染色体大不相同。

从上述的观察结果可以看出，细菌类核体的亚显微形象是最易变的，会因固定方法的不同而有显著的差异。典型涡鞭毛虫的染色体在只用戊二醛固定时，染色质也像细菌的类核体一样会发生剧烈的收缩，从而造成恶劣的亚显微形象。尖尾虫的染色体则完全不然，并不因固定方法的不同而在精细形象上出现显著的差异。即使只用戊二醛固定，其染色质也不会发生收缩从而造成空白区域。这表现出了跟眼虫的致密染色体及高等生物的异染色质一样的固定特性。这显然与其染色体中含有相当多的染色体碱性蛋白有关（孙毓麟等，1978）。而在典型涡鞭毛虫的染色体中碱性蛋白含量极少（Rizzo 等，1973）。此外，这也可能与尖尾虫的染色质具有类似核小体的结构（Fan 等，1981）有关。在典型涡鞭毛虫的染色质中，迄今尚未发现有核小体或类核小体结构存在。

表 1　眼虫类、典型涡鞭毛虫类与尖尾虫的特性比较

Tab.1　The comparisons on the characteristics of euglenoids, typical dinoflagellates and *Oxyrrhis*

	眼虫	典型涡鞭毛虫	尖尾虫
染色体横带	无 (Dodge, 1973)	有 (KuBai 等，1969)	无 (Gao 等，1986)
染色体碱性蛋白性质	典型 5 种组蛋白 (Bre 等，1980)	1 或 2 种碱性非组蛋白 (Rizzo 等，74a, b)	5 种碱性蛋白 (文建凡等，待发表)
染色体碱性蛋白与 DNA 之比	Histone: DNA = 1 (Bre 等，1980)	0.02—0.08 (Rizzo 等，1973)	0.5* (孙毓麟等, 1978)
核小体结构	典型核小体 (Haapala 等，1975)	无 (Rizzo 等，1980)	有(Fan 等，1981; 1981; 高小平，未发表)
DNA 羟甲基尿嘧啶	无	有(Rizzo, 1987)	无(张志新, 待发表)
细胞分裂形式	核内有丝分裂 (Gillott 等，1978)	核外有丝分裂 (KuBai 等，1969)	核内有丝分裂 (Gao 等，1986)
三氯醋酸处理(5%, 90℃, 15 min)后	染色体依然存在 (李靖炎等, 1978)	染色体溶去 (李靖炎等，1979)	染色体依然存在 (李靖炎等, 1978)

* 从后来研究的情况来看，比值应远大于 0.5。

本工作的结果又进一步地显示了尖尾虫与典型涡鞭毛虫之间的巨大差别。染色体上的着丝粒蛋白与动粒蛋白是相当保守的，但不久前吴传芬博士在我们实验室研究着丝粒蛋白与动粒蛋白的起源与进化时却发现，尖尾虫与典型涡鞭毛虫在这方面也有明显的区别。以抗人着丝粒蛋白 B 的单抗 mACA-2 作电泳时，尖尾虫象人、纤毛虫与眼虫一样，有 80、120 与 160 kD 的 3 条阳性带，而典型涡鞭毛虫却只有 80 与 120 kD 的两条带（现存

最原始的真核生物贾第虫（*Giardia*）则只有其中的80 kD 1条）。以抗CHO细胞的动粒蛋白的单抗mAb37A5作检验时发现，典型涡鞭毛虫除了有纤毛虫、眼虫与尖尾虫等所具有的45与120 kD两条阳性蛋白带之外，还具有它们没有的50 kD带，而最原始的真核生物贾第虫与3类不同的原细菌全都如此（吴传芬等，1996）。

从细胞生物学与分子生物学的重大特性来看，如果把涡鞭毛虫类视为一个门，则这个门首先应分为尖尾虫（藻）亚门涡鞭毛虫亚门，后者再进一步分为合沟虫超纲与涡鞭毛虫超纲，后一超纲又再分为纵裂涡鞭毛虫纲和横裂涡鞭毛虫纲。但如果赞同Corliss(1984)的看法，把涡鞭毛虫类视为一个大类群（超界），则尖尾虫应代表着一个独立的门——尖尾虫门（Oxyrrhinea）；而合沟虫（*Syndinium*）所代表的却只应是多甲虫（藻）(Peridinea）门中的一个亚门，而不应该被视为一个独立的门，因为从合沟虫的有丝分裂方式（Ris等，1974）来看，它与一般涡鞭毛虫类的有丝分裂方式（dinomitosis）有着明显的联系。尖尾虫的有丝分裂方式（Gao等，1986）与合沟虫的及一般涡鞭毛虫的有丝分裂方式都相距甚远，与变形虫等许多原生生物的核内有丝分裂倒是有着明显的联系。

上述的看法距藻类学家传统的看法，例如Taylor(1980)的看法相距颇远，但是却符合Loeblich（1984）关于涡鞭毛虫类的进化的看法。Loeblich在此文中引证了我们与上海细胞所的同志们的许多研究结果。应该指出，我们的上述看法也完全符合于近年来Lenares等（1991）用20种涡鞭毛虫的24S rRNA所作的分子进化研究。该研究指出，尖尾虫是最早从涡鞭毛虫大类中间分歧出来的独特的一支。因此分子进化的研究结果与我们的看法相吻合。

图版说明

图版Ⅰ(Plate Ⅰ)

1. 人肠道细菌类核体，戊二醛固定（Nucleoid of the excrement bacterium, fixed with glutaraldehyde, Nu: nucleoid）×40 000
2. 人肠道细菌类核体，锇酸固定（Nucleoid of the excrement bacterium, fixed with OsO_4）×40 000
3. 人肠道细菌类核体，"R-K法"固定（Nucleoid of the excrement bacterium, fixed with "R-K standard method"）×40 000
4. 人肠道细菌类核体，戊二醛加"R-K法"固定（Nucleoid of the excrement bacterium, fixed with both glutaraldenhyde and "R-K standard method"）×40 000
5. 人肠道细菌类核体，戊二醛和锇酸固定（Nucleoid of the excrement bacterium, fixed with glutaraldehyde-OsO_4）×40 000
6. 眼虫染色体，戊二醛固定（Chromosomes of *Euglena* sp., fixed with glutaraldehyde）×30 000
7. 眼虫染色体，锇酸固定（Chromosomes of *Euglena* sp., fixed with OsO_4）×30 000
8. 眼虫染色体，戊二醛和锇酸双固定（Chromosomes of *Euglena* sp., fixed with glutaraldehyde-OsO_4）×30 000
9. 闪光双甲藻染色体，戊二醛固定（Chromosomes of *Prorocentrum micans*, fixed with glutaraldehyde）×30 000
10. 闪光双甲藻染色体，锇酸固定（Chromosomes of *P. micans*, fixed with OsO_4）×30 000
11. 闪光双甲藻染色体，戊二醛和锇酸双固定（Chromosomes of *P. micans*, fixed with glutaraldehyde-OsO_4）×30 000
12. 尖尾虫染色体，戊二醛固定（Chromosomes of *O. marina*, fixed with glutaraldehyde）×38 000
13. 尖尾虫染色体，锇酸固定（Chromosomes of *O. marina*, fixed with OsO_4）×24 000
14. 尖尾虫染色体，戊二醛和锇酸双固定（Chromosomes of *O. marina*, fixed with glutaraldehyde-OsO_4）×30 000

参考文献

孙毓麟，范佩芳，商伟明，1978 尖尾藻染色质的酸溶性蛋白的分析. 实验生物学报，**11**：297—302.

李靖炎，乔以炯，1979. 涡鞭毛虫细胞碱性蛋白的细胞化学检查. I. 双脚多甲藻*P. Bipes*. 实验生物学报，**12**：123—129.

李靖炎、陈向虹、乔以炯、1978. 尖尾藻染色体碱性蛋白的细胞化学检查. 实验生物学报，**11**：303—308.

吴传芬、李靖炎、代嘉陵等、1996. 涡鞭毛虫（甲藻）着丝粒／动蛋白的检查. 动物学研究. **17**(3)：307-313.

Bre M-H, Delpech S, Champagne M *et al*, 1980. Analyse des histones et de l′ and Nucléosomal de l′ Euglène normale et darencée en vitamine B_{12} *C r Acad. Sci Paris*, D290, 93-96.

Corliss J O, 1983 The kingdom protista and its 45 phyla *Biosystems* **17**: 87-162.

Dodge J D, 1973. The fine structure of algae cell New York: Acad. Press 143-146

Fan P-F, Gao R-Q, Zhang Z-X, 1981 Preliminary study on the chromatin structure of a dinoflagellate, *O marina*. Proc. of the Joint China-US Phycol. Symp. (Nov 16-20, 1981), Sci. Press. 97-106.

Gao X-P, Li J-Y, 1986. Nuclear division in the marine dinoflagellate *O marina*. *J. Cell Sci.*, **85**: 161-175.

Gillott M A, Triemer R E, 1978. The ultrastructure of cell division in *E. gammardlus* (Pallas.). *J. Protozool.*, **26**: 390-403.

Haapala O K, Soyer M-O, 1975. Organization of chromosome fibrils in *E. gracilis* *Hereditas*, **80**: 185-194.

KuBai D F, Ris H, 1969. Division in the dinoflagellate *C. cohnii* (Schiller). A new type of nuclear reproduction. *J. Cell Biol.*, **40**: 508-528.

Lenaers G, Scholin C, Bhaud Y *et al*, 1991. A molecular phylogeny of dinoflagellates inferred from the sequence of 24S rRNA divergent domains Dl and D8. *J. Mol. Evol.*, **32**: 53-63.

Li J-Y, 1990. *O. marina* observed from the viewpoint of evolutionary cell biology. In: Programme and abstracts of Ist. Inter. Symp. on Free-Living Heterotrophic Flagellates (Aug. 6-11, 1990, Helsingor, Denmark).

Loeblich A R, 1984. Dinoflagellate evolution. In: Dinoflagellates. Acad. Press. 481-522.

Ris J, KuBai D F, 1974. An unusual mitotic mechanism in the parasitic protozoan *Syndinium* sp. *J. Cell Biol.*, **60**: 702-720.

Rizzo P J, 1987. The Biochemistry of dinoflagellate nucleus. In: Taylor F J R. The biology of dinoflagellates. Blackwell. 143-173.

Rizzo P J, Burghardt R C, 1980. Chromation structure in the unicellular algae *O. luteus*, *C. cohnii* and *P. balticum* *Chromosoma*, **76**: 91-99.

Rizzo P J, Nooden L D, 1973. Isolation and chemical composition of dinoflagellate nuclei. *J. Protozool.*, **20**: 666-672

Rizzo P J, Nooden L D, 1974a. Isolation and partial characterization of dinoflagellate chromatin. *Biochim Biophys Acta*, **394**: 402-414.

Rizzo P J, Nooden L D, 1974b. Partial characterization of dinoflagellate chromatin. *Biochim Biophys. Acta*, **394**: 415-427.

Ryter A, Kellenberger E, 1958. Etude avec microscope électronique de plasmas contenant de l′acide désoxyribonucléique. 1. Les nucleoides des bactéries en croissance active. *Z. Natureforsch.*, **13b**: 597-605.

Taylor F J R, 1980 On dinoflagellate evolution. *Biosystems*, **13**: 65-108.

THE COMPARATIVE STUDY ON THE CHROMOSOMES OF *Oxyrrhis marina* AND TYPICAL DINOFLAGELLATE PAYING SPECIAL ATTENTION TO THE SYSTEMATIC POSITION OF THIS ORGANISM

Zhang Chaoying　　Zeng Congmei[①]　　Li Jingyan[**]

(*Laboratory of Cellular and Molecular Evolution, Kunming Institute of Zoology, the Chinese Academy of Sciences, Kunming* 650223)

Abstract

Our laboratory and Shanghai Institute of Cell Biology have done a series of works on

the cell biology and biochemistry of special dimoflagellate, *Oxyrrhis marina* for many years. The present work is one amony them.

The fine features of the constantly condensed chromosomes of the special dinoflagellate *Oxyrrhis marina* and the effects of different fixations on the fine featrues were observed and compared with those of the nucleoid of a species of human excrement bacteria, and of the constantly condensed chromosomes of a typical dinoflagellate *Prorocentrum micans* and a flagellate *Euglena* sp..

Materials were fixed with glutaraldehyde (3%, pH7.0), OsO_4 (1.5%, pH7.0), and glutaraldehyde-OsO_4, respectively. The bacteria were also fixed with Ryter and Kellenberger's so-called "standard method". Ultrathin sections were made and stained with uranyl salt routinedly.

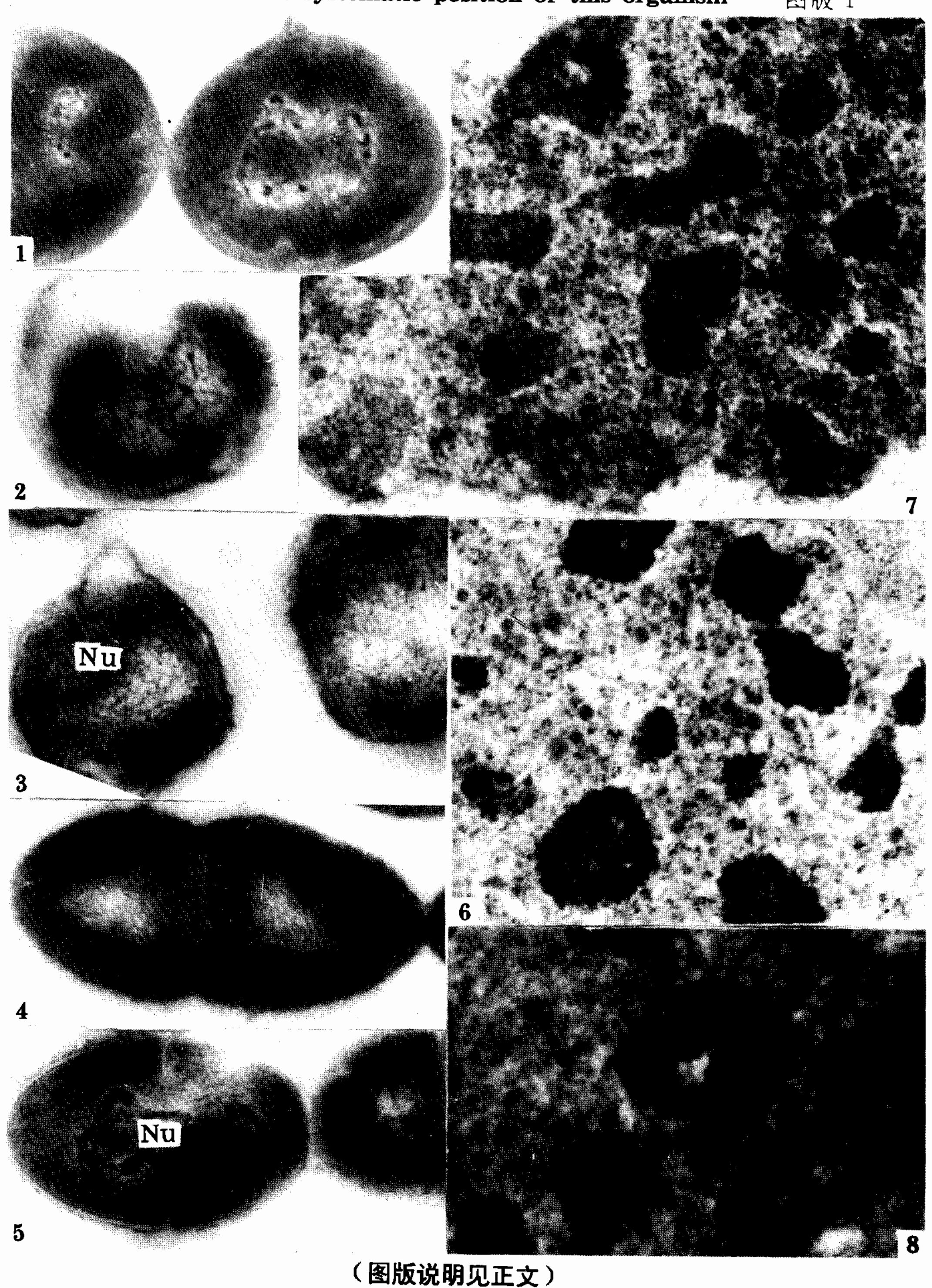
The fine features of the bacterial nucleoid varied greatly depending upon the fixation methodes used (Figs. 1-5). On the contrary, the features of the condensed chromosomes of *Euglena* sp. showed no evident changes when different fixation methods were used (Figs. 6-8). As for the condensed chromosomes of typical dinoflagellate, *P. micans*, both OsO_4 fixation and glutaraldehyde-OsO_4 fixation gave the typical banding features of dinoflagllate chromosomes (Figs. 10 and 11), while glutaraldehyde fixation resulted in quite different features (Fig.9). Being quite different from the condensed chromosomes of common dinoflagellates, the condensed chromosomes of the special dinoflagellate, *Oxyrrhis marina*, showed fine features somewhat similar to those of the *Euglena* chromosomes. Different fixation methods did not give evident changes on the fine features of *Oxyrrhis* chromosomes either(Figs. 12-14).

In this respect, *O. marina* chromosomes were similar to the condensed chromosomes of *Euglena* and distinct from those of other dinoflagellates.

Lots of evidences in cell biology and molecular biology, that have been accumulated, indicated that *Oxyrrhis* is quite different from other dinoflagellates, but similar and closer to other flagellates. *Oxyrrhis* chromosomes are not dissolved when DNA: is removed; *Oxyrrhis* DNA does not contain hydroxymethyl uracil; *Oxyrrhis* chromatin contains histone-related protein and nucleosome-like particles; its nucleus divides by means of a special endomitosis, which is very different from the dinomitosis of typical dinoflagellates. The present work provides the differece in a new respect.

All these facts indicate that *Oxyrrhis* represents a special group of flagelles which link the common flagellates with dinoflagellates. A new phylum, Phylum Oxyrrhinea, is suggested. This idea tallies with the result of the molecular evolution study of 24S rRNAs of *Oxyrrhis* and verious dinoflagellates (Lenares *et al.*, 1991).

Key words *Oxyrrhis marina*, Dinoflagellates, Chromosme, Effects of different fixation methods, Phylum Oxyrrhinea



（图版说明见正文）

图版 II



（图版说明见正文）